

能動輸送膜型リアクターによる  
微水系酵素反応システムの開発

課題番号：09555235

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金  
基盤研究(B)(2)研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 米本年邦  
東北大学大学院工学研究科教授

## はしがき

### 研究組織

研究代表者 : 米本年邦 (東北大学大学院工学研究科教授)  
研究分担者 : 川勝孝博 (東北大学大学院工学研究科助手)  
研究分担者 : 北川尚美 (東北大学大学院工学研究科助手)  
研究分担者 : 中島光敏 (農林水産省食品総合研究所食品工学部室長)  
( 研究協力者 : 里村光信 (東北大学工学部学部生) )  
( 研究協力者 : 小池章吾 (東北大学工学部学部生) )  
( 研究協力者 : 加賀谷紀貴 (東北大学工学部学部生) )

### 研究経費

平成 9 年度	9,300 千円
平成 10 年度	1,700 千円
計	11,000 千円

### 研究発表

(1) 口頭発表 (N. Shibasaki-Kitakawa et al., Continuous Hydrolysis of Oligosaccharide using Column Reactor packed with Immobilized Enzyme Particles, The 1998 Annual Meeting of the American Institute of Chemical Engineers, Session 42 (Miami Beach, USA), 1998.11.18)

東北大学図書



00010140641

附属図書館

## <目次>

### 第Ⅰ部 酢酸セルロース膜によるヘキサン中の脂肪酸の分離

第1章 緒論 .....	I - 1
1.1 緒論 .....	I - 1
1.2 目的 .....	I - 2
第2章 実験方法 .....	I - 3
2.1 膜の作製 .....	I - 3
2.1.1 ドープ液（高粘性調製液）の調製 .....	I - 3
2.1.2 膜の作製方法 .....	I - 3
2.1.3 膜の熱処理 .....	I - 5
2.2 溶媒・溶質 .....	I - 5
2.3 実験装置・実験手順 .....	I - 5
2.4 脂肪酸の分析 .....	I - 7
2.5 解析 .....	I - 9
第3章 結果と考察 .....	I - 10
3.1 膜の選定 .....	I - 10
3.2 脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験 .....	I - 10
3.2.1 オレイン酸－ヘキサン系 .....	I - 10
3.2.2 ミリスチン酸－ヘキサン系 .....	I - 11
3.2.3 デカン酸－ヘキサン系 .....	I - 13
3.3 阻止率 .....	I - 13
3.4 脂肪酸混合溶液のろ過実験 .....	I - 14
第4章 結言 .....	I - 16
参考文献 .....	I - 17

### 第Ⅱ部 Oil－Water 二相系でのリパーゼによるトリオレインの加水分解速度

第1章 緒論 .....	Ⅱ - 1
--------------	-------

1.1 本研究の背景 .....	II - 1
1.2 本研究の目的および概要 .....	II - 2
第2章 実験 .....	II - 3
2.1 実験装置 .....	II - 3
2.2 実験方法および条件 .....	II - 4
2.3 分析 .....	II - 7
第3章 結果と考察 .....	II - 8
3.1 初期基質濃度の影響 .....	II - 8
3.2 酵素濃度の影響 .....	II - 10
3.3 生成物阻害の影響 .....	II - 12
3.4 反応機構の検討 .....	II - 15
第4章 結言 .....	II - 21
参考文献 .....	II - 22



## 第 I 部

酢酸セルロース膜による  
ヘキサン中の脂肪酸の分離

# 第 1 章 緒 論

## 1.1 緒 言

化学工学において、分離操作はきわめて重要な地位を占めており、その手法は実に様々である。しかしながら、それぞれが長所短所を持ち合わせているため、目的に応じて使い分ける必要がある。分離操作の中で、膜分離法は比較的新しい方法であり、溶媒同士、あるいは、溶媒中に存在している溶質の分離や濃縮を、常温で行うことができるという特徴を有する。従って、食品産業においても、タンパク質や糖類、香料成分などの熱による変性・揮発を防ぐことができるため、果汁・チーズホエーの濃縮、清澄化、除菌などに広く用いられている。<sup>1-2)</sup>

食品産業で実用化されている膜分離プロセスは、ほとんどが水系を対象としたものであるが、非水系においても、粗製油の精製過程における油脂成分（リン脂質、脂肪酸、色素など）の分離への適用が有力視されている<sup>3)</sup>。油脂成分の中でも脂肪酸は、医薬品・食品・香料などの原料として有用であり、油（トリグリセリド）を溶媒中で加水分解することにより得ることができる<sup>4)</sup>。得られた脂肪酸溶液には、様々な炭素数・飽和度の脂肪酸が含まれるため、単離・精製を行う必要がある。

Raman らは<sup>5)</sup>、市販されている 13 種の逆浸透膜を用いて、大豆油と脂肪酸の混合メタノール溶液中のトリグリセリドおよび脂肪酸の分離性能を測定した。Kumar らは<sup>6)</sup>、Groundnuts 油をエタノールを用いて抽出し、3 種の膜を使用して抽出相のろ過を行うことにより、脂肪酸透過率を測定した。使用した膜の中で、酢酸セルロース膜では 80% もの高い脂肪酸透過率が得られたことを報告している。Keurentjes らは<sup>7)</sup>、セルロース膜、酢酸セルロース膜を用いて、カプロン酸、カプリン酸、オレイン酸を混合した 1,2-ブタンジオール溶液のろ過を行った際に、脂肪酸の種類によって阻止性能が異なることを報告している。また、有機溶媒中における脂肪酸以外の溶質の分離に関して、Reddy らは<sup>8)</sup>、4 種類の膜と 12 種類の溶媒を用い

て、L-アスパラギン酸と L-フェニルアラニン誘導体の阻止率を測定している。この結果、他の膜と異なり、酢酸セルロース膜では L-アスパラギン酸と L-フェニルアラニン誘導体の阻止率に大きな差が生じることを報告している。

以上のことから、酢酸セルロース膜は、有機溶媒中で溶質の種類により異なる分離特性、特に、脂肪酸に対して高い透過性能を有することが期待される。

## 1.2 目的

本研究では、自作した酢酸セルロース膜を用いて、ヘキサン中の脂肪酸の膜分離特性に関して基礎的検討を行うことを目的とする。

本研究は全編 4 章より構成されている。

第 1 章では、本研究の背景および目的を述べる。

第 2 章では、膜の作製方法ならびに実験操作について述べる。

第 3 章では、作製した膜を用いて、脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験を行った結果について述べる。

第 4 章では、本研究の総括について述べる。

## 第2章 実験方法

### 2.1 膜の作製

#### 2.1.1 ドープ液（高粘性調製液）の調製

[酢酸セルロース：ホルムアミド：アセトン]を重量比で[5：8：12]で混合することによりドープ液を調製した<sup>10)11)</sup>。酢酸セルロースは、イーストマン・コダック社の CA398-30 を、また、ホルムアミドおよびアセトンは和光純薬より購入した特級を使用した。

#### 2.1.2 膜の作製方法

膜の作製手順を Fig2.1 に示す。膜厚を整えるために、ステンレスチューブを 2 本、ガラス板上に張り、その間にドープ液をキャストした。これをガラス棒（直径 8mm）を用いて、一定速度で 2～3 秒間で引き伸ばし、30 秒間大気中で放置することにより、表面の溶媒を蒸発させた。この後、すぐに 10℃前後の冷水（氷水）に浸すことにより、ゲル化させた。冷水につけたまま一昼夜放置することにより溶媒を除去し、膜モジュールのサイズ（直径 75mm）に切り抜いた。なお、ステンレスチューブの管径（0.3mm, 0.55mm）を変えることにより膜厚を調整した。

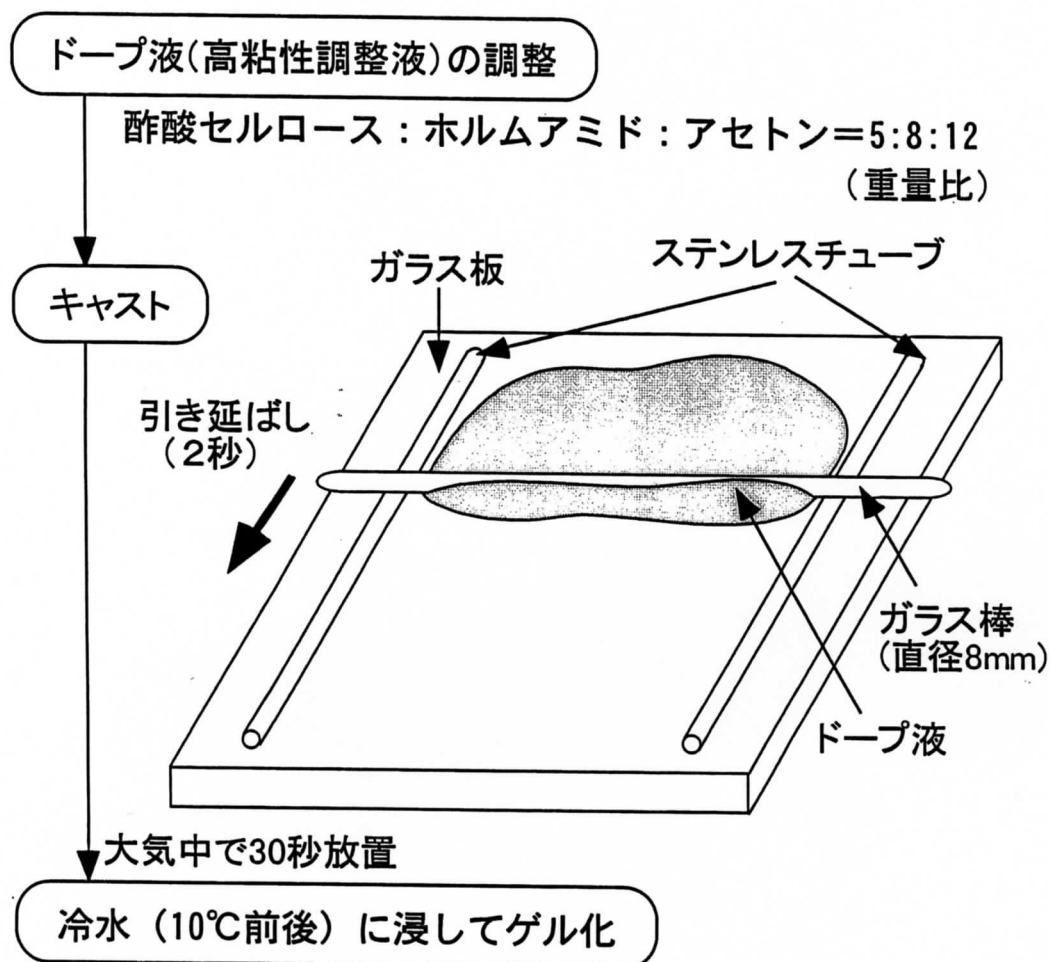


Fig. 2.1 酢酸セルロース膜の作製方法

### 2.1.3 膜の熱処理

酢酸セルロース膜を 50℃以上で熱処理することにより、表面を緻密化させることができる。切り抜いた膜の端をシリコンチューブ（直径 8mm）で 6カ所押さえながら 2枚のシャーレではさみ、シャーレごとビーカーに沈め、ビーカーを恒温槽に入れた。攪拌を行いながら、昇温速度 2~3℃/min でゆっくりと水温を上げ、80℃みに到達した後、そのまま 10分間一定温度を保つことにより、熱処理を行った。熱処理後は恒温槽からビーカーごと取り出してそのまま放置し、温度を室温まで下げた。

## 2.2 溶媒・溶質

透過実験に使用する溶媒として和光純薬より購入したエタノール（特級、純度 99.5%）およびヘキサン（特級、純度 96.0%）を用いた。溶質として和光純薬より購入した、オレイン酸（ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ , 分子量 282.46、1級、純度 75%）、ミリスチン酸（ $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOH}$ , 分子量 228.37、特級、純度 98.0%）、デカン酸（ $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{COOH}$ , 分子量 172.27、特級、純度 99%）を使用し、浸透圧が影響しないと思われる 0.1wt%程度（浸透圧が 2800Pa 以下）の低濃度のヘキサン溶液とした。

## 2.3 実験装置・実験手順

実験装置図を Fig2.2 に示す。膜モジュールとして日東電工製（有効膜面積は実測で  $35.26\text{cm}^2$ ）の回分式セルを使用した。恒温槽を用いて回分式セル内の溶液温度を 25℃で一定とし、窒素ガスを用いて加圧（0.49MPa~1.96MPa）することにより、ろ過実験を行った。膜の緻密性を確認するために、純水で、1.96MPa, 0.96MPa, 1.47MPa, 1.96MPa の順に圧力を変化させ、体積流束の圧力依存性を測定した。体積流束が著しく高いものや、直線性が得られない膜は以降の測定には用いなかった。酢酸セルロース膜は親水性であり、製法上、膜内に水が存在し、疎水性溶媒が膜中に入ることを妨げる。このため、

一旦エタノールを透過させた後に、疎水性溶媒であるヘキサンを透過させることにより、溶媒置換を行った。その際に、純水から直接純エタノールに溶媒を置換すると膜が破損しやすいことが分かったため、透過させるエタノール濃度を順次 20wt%, 50wt%, 80wt%, 100wt%と上げていった。ヘキサン溶媒を用いた実験では、揮発を防ぐためにエタノール-ドライアイスを使用したコールドトラップ（実測値で  $-75^{\circ}\text{C}$ ）を用いて、透過液を回収した。また、脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験では、原液側での濃度分極を防ぐために 560rpm で攪拌を行った。

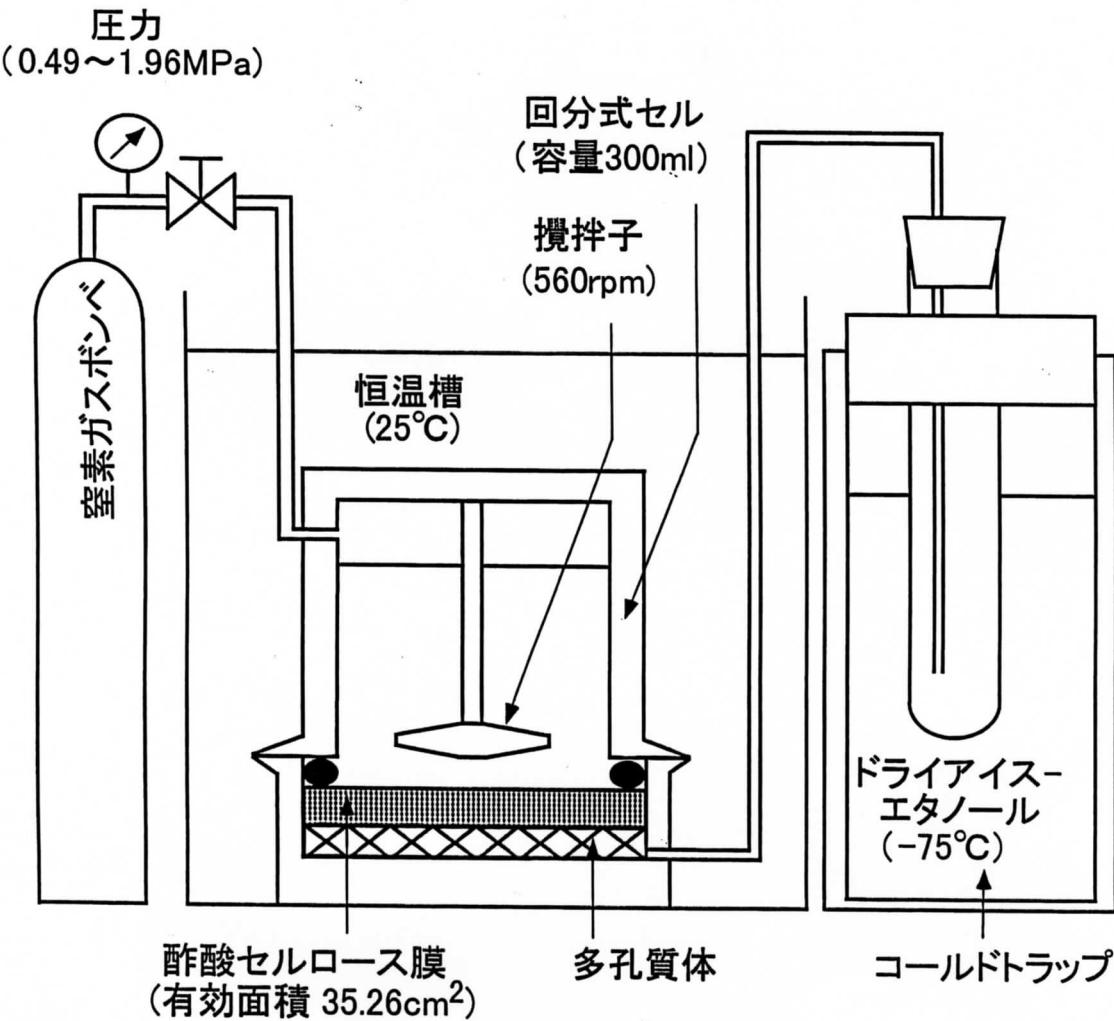


Fig. 2.2 実験装置

## 2.4 脂肪酸の分析

脂肪酸を紫外光（UV）吸光度で定量するための発色試薬として、ADAM 試薬（フナコシ(株)製）を使用した。脂肪酸と ADAM 試薬は、Fig2.3 に示すように反応し、一時間程度で反応は終了する。

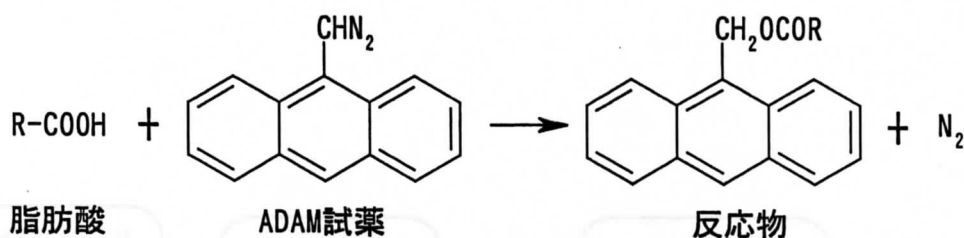


Fig. 2.3 脂肪酸と ADAM 試薬の反応

分析手順を Fig. 2.4 に示す。まず、ADAM 試薬溶液（ADAM 試薬 0.01g をメタノール-THF 溶液（50v/v%）10mL に溶解させた溶液）を 600  $\mu$ L、サンプリングした脂肪酸のヘキサン溶液を 150  $\mu$ L、アセトンを 150  $\mu$ L ずつ混合して分析用試料とした。この分析用試料を室温で 1 時間放置し、十分に反応させた後に、高速液体クロマトグラフィ（日立製）を用いて UV 吸光度を測定した。高速液体クロマトグラフィの分析条件は、カラムはイナートシル ODS-5、吸収波長は 250nm を使用し、溶離液はアセトニトリルである。

一つのサンプルについて、原液および保持液は 5～6 回、透過液は 3 回ずつ分析し、その平均値をとり、別に作製した検量線を用いて脂肪酸の濃度を求めた。



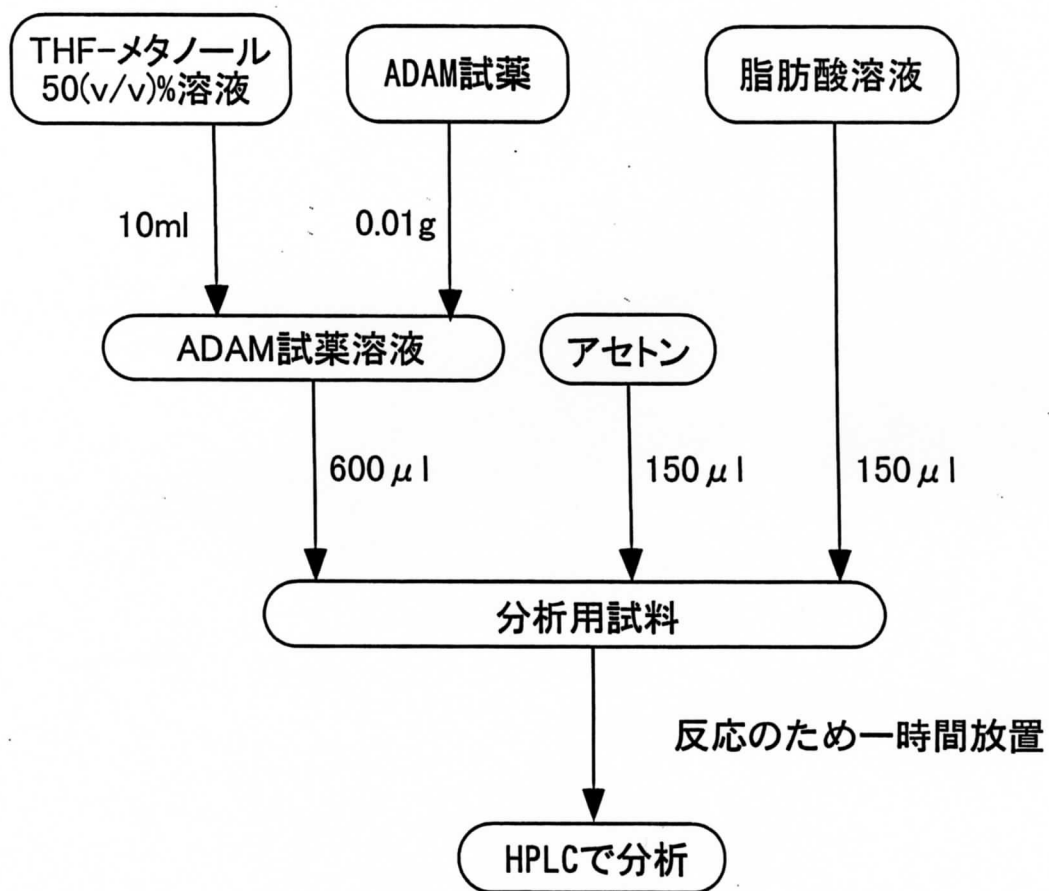


Fig. 2.4 脂肪酸の分析手順

## 2.5 解析

・回分式ろ過実験における模式図を Fig. 2.5 に示す。脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験において、脂肪酸の物質収支をとると、以下の式が成立する。

$$\frac{d(C_1 V_1)}{dt} = -(1-f)C_1 J_v S \quad (1)$$

ここで  $C_1$  は脂肪酸の保持液側濃度 [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]、 $V_1$  は保持液体積 [ $\text{m}^3$ ]、 $f$  は膜の阻止率 [-]（負の値の場合もある）、 $J_v$  は体積流束 [ $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ]、 $S$  は膜面積 [ $\text{m}^2$ ] である。また、体積基準の物質収支をとると次の式が成立する。

$$\frac{dV_1}{dt} = -J_v S \quad (2)$$

(1), (2)式より、次の式が得られる。

$$\frac{dC_1}{dV_1} = -f \frac{C_1}{V_1} \quad (3)$$

ろ過過程において膜性能が変化せず、 $f$  が一定と仮定すると、(3)式を積分することにより、以下の式を得る。

$$f = \frac{\ln(C_1 / C_0)}{\ln(V_0 / V_1)} \quad (4)$$

ここで  $C_0$  は脂肪酸の原液濃度 [ $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ]、 $V_0$  は原液体積 [ $\text{m}^3$ ] である。

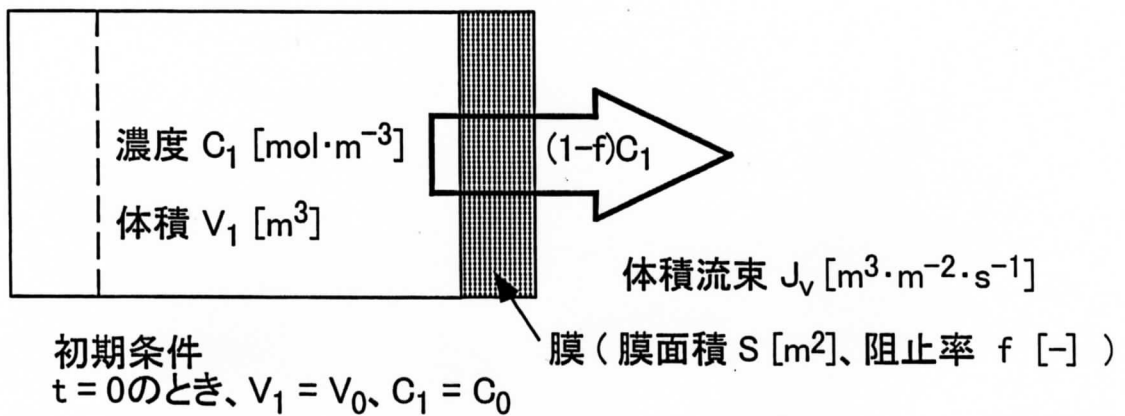


Fig. 2.5 回分式ろ過実験における模式図

## 第3章 結果と考察

### 3.1 膜の選定

外径  $300\mu\text{m}$  のステンレスチューブを用いて製作した膜を TypeA1、 $80^{\circ}\text{C}$  で熱処理したものを TypeA2、外径  $550\mu\text{m}$  のステンレスチューブを用いて作製したものを TypeB1、それを熱処理したものを TypeB2 とした。TypeA1 は膜厚が薄いことに加え、熱処理を施していないので弱く、実験中に破損する可能性が高いため、脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験には使用しなかった。熱処理を施していない膜で強度を上げるために膜厚を大としたものが TypeB1 であり、これを熱処理することにより緻密性を上げたものが TypeB2 である。TypeB2 で予備実験として、ミリスチン酸のヘキサン溶液のろ過実験を行ったところ、体積流束が  $10^{-12}[\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$  と非常に小さくなり、十分な透過液量を得ることが困難であると判断した。このため、TypeA2 と TypeB1 を脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験に使用した。

### 3.2 脂肪酸のヘキサン溶液のろ過実験

#### 3.2.1 オレイン酸-ヘキサン系

オレイン酸のヘキサン溶液のろ過実験を行った結果を、TypeA2 について Table3.2-1(a)に、TypeB1 について Table3.2-1(b)に示す。原液は供試した溶液であり、透過液は膜を透過してきた溶液である。保持液は、実験終了後に回分式セル内に残っていた溶液のことである。表中にそれぞれの溶液におけるヘキサン、オレイン酸の重量そしてオレイン酸の濃度をまとめている。損失分の横に記述してある百分率は、実験前（原液）と実験終了時（透過液と保持液）で物質収支をとった際の損失分の原液に対する割合を表している。

Table3.2-1(a) TypeA2 膜におけるオレイン酸の  
ヘキサン溶液のろ過実験結果

TypeA2	ヘキサン 重量[g]	オレイン酸 重量[g]	オレイン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]
原液	157.83	0.1714	10.86
保持液	133.85	0.1489	11.13
透過液	23.80	0.0155	6.51
損失分	0.18 (0.11%)	0.0070 (4.08%)	-

ろ過時間:65.8時間

Table3.2-1(b) TypeB1 膜におけるオレイン酸の  
ヘキサン溶液のろ過実験結果

TypeB1	ヘキサン 重量[g]	オレイン酸 重量[g]	オレイン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]
原液	153.12	0.1804	11.72
保持液	136.84	0.1721	12.57
透過液	11.73	0.0068	5.80
損失分	4.55 (2.97%)	0.0016 (0.86%)	-

ろ過時間:141.3時間

TypeA2, TypeB1 において、損失分は 4.1%以下である。いずれのタイプの膜でも、保持液濃度は原液濃度よりも高くなり、また、透過液濃度は原液濃度よりも低くなっている。これは、オレイン酸が酢酸セルロース膜により阻止され、保持液側で濃縮されていることを意味している。

### 3.2.2 ミリスチン酸-ヘキサン系

ミリスチン酸のヘキサン溶液のろ過実験を行った結果を、TypeA2 について Table3.2.2(a)に、TypeB1 について Table3.2.2(b)に示す。TypeA2 では、コールドトラップ内配管壁面に析出したミリスチン酸の回収が不十分であったため、透過液ミリスチン酸濃度、および透

過液ミリスチン酸重量は未計測である。TypeB1 では、析出したミリスチン酸をアセトンを用いて洗浄することにより回収した。

Table3.2.2(a) TypeA2 膜におけるミリスチン酸の  
ヘキサン溶液のろ過実験結果

TypeA2	ヘキサン 重量[g]	ミリスチン酸 重量[g]	ミリスチン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]
原液	153.72	0.1995	12.98
保持液	145.92	0.1789	12.26
透過液	6.48	-	-
損失分	1.94 (1.26%)	-	-

ろ過時間:12.3時間

Table3.2.2(b) TypeB1 膜におけるミリスチン酸の  
ヘキサン溶液のろ過実験結果

TypeB1	ヘキサン 重量[g]	ミリスチン酸 重量[g]	ミリスチン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]
原液	159.17	0.1447	9.09
保持液	138.96	0.1242	8.94
透過液	19.24	0.0200	10.84
損失分	0.97 (0.61%)	0.0005 (0.35%)	12.26

ろ過時間:39.6時間

TypeA2 において、それぞれの濃度に注目すると、保持液濃度が原液濃度よりも低くなっている。物質収支を取り、ミリスチン酸の損失が全くないと仮定すると、ミリスチン酸の透過液濃度は  $31.69 \times 10^{-2}$ wt% となり、原液濃度よりも高濃度となる。

TypeB1 においても、保持液濃度は原液濃度よりも低く、また、透過液濃度は原液濃度よりも高くなっている。

以上のことから、ミリスチン酸は酢酸セルロース膜により、透過液側に濃縮されることが分かった。

3.2.3 デカン酸-ヘキサン系

TypeB1 を用いて、デカン酸のヘキサン溶液のろ過実験を行った結果を、Table3.2.3 に示す。

Table3.2.3 TypeB1 膜におけるデカン酸の  
ヘキサン溶液のろ過実験結果

TypeB1	ヘキサン 重量[g]	デカン酸 重量[g]	デカン酸濃度 [×10 <sup>-2</sup> wt%]
原液	169.35	0.1985	11.71
保持液	147.54	0.1646	11.15
透過液	21.67	0.0309	14.26
損失分	0.14 (0.08%)	0.0030 (1.51%)	-

ろ過時間:92.8時間

デカン酸の場合には、ミリスチン酸と同様に保持液濃度が原液濃度よりも低くなっており、また、透過液濃度が原液濃度よりも高くなっている。このことから、デカン酸も酢酸セルロース膜により透過液側で濃縮されていることが分かった。

3.3 阻止率

TypeA2 および TypeB1 を用いた際の、オレイン酸（分子量 282.46）、ミリスチン酸（分子量 228.37）、デカン酸（分子量 172.27）の阻止率を、(4)式を用いて算出した結果を Table3.3 にまとめた。

Table3.3 各溶質の阻止率

	オレイン酸	ミリスチン酸	デカン酸
TypeA2	0.14	-1.09	-
TypeB1	0.62	-0.12	-0.35

TypeA2 と TypeB1 において、オレイン酸では正の阻止率、ミリスチン酸では負の阻止率と同じ傾向を得ることができた。TypeB1 では、デカン酸の阻止率は負の値であり、ミリスチン酸の阻止率よりも絶対値が大きくなっている。それぞれの膜について、使用した脂肪酸の阻止率は分子量の順に小さくなっているが、この傾向が他の脂肪酸でも成立するか否かについては、今後の検討が必要がある。

### 3.4 脂肪酸混合溶液のろ過実験

使用した膜は TypeB1 である。溶質としてオレイン酸、ミリスチン酸をそれぞれ 0.1wt%程度になるように混合したヘキサン溶液を供試した。この混合溶液を用いた実験結果を Table3.4 に示す。

Table3.5 TypeB1 膜における脂肪酸混合溶液のろ過実験結果

TypeB1	ヘキサン 重量[g]	ミリスチン酸 重量[g]	ミリスチン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]	オレイン酸 重量[g]	オレイン酸濃度 [ $\times 10^{-2}$ wt%]
原液	190.51	0.2116	11.11	0.2261	11.87
保持液	173.30	0.1910	11.02	0.2057	11.39
透過液	16.78	0.0048	2.86	0.0091	5.43
損失分	0.43 (0.23%)	0.0159 (7.50%)	-	0.0113 (5.01%)	-

ろ過時間:96.7時間

ここで物質収支を考えると、オレイン酸およびミリスチン酸の損失分はそれぞれ 7.50%, 5.01%となっている。この物質収支が悪い原因としては、配管内に残留した溶質の回収が不十分であったことが考えられる。損失分が大きいいため、阻止率の算出は行わなかった。これは、損失分が透過液側・保持液側のどちらにどれだけ存在しているかによって、解析結果が大きく変わってくるためである。溶質の損失分がすべて透過液側に存在していると仮定した場合、ミリスチン酸とオレイン酸の透過液濃度は、それぞれ、 $12.43 \times 10^{-2}$  wt%,  $12.16 \times 10^{-2}$  wt%となり、双方ともわずかに濃縮していることになる。これは、単成分の脂肪酸溶液ろ過実験から予想された結果と異なる。この理由としては、脂肪酸同士の相互作用が脂肪酸とヘキサン相互作用よりも強く、オレイン酸が移動速度の大きいミリスチン酸と一

緒に透過してしまったことが考えられる。脂肪酸混合溶液でオレイン酸が濃縮したことについては新たな知見であるが、今回の実験は、物質収支の点で十分とはいえないので、今後再検討を行う必要がある。



## 第四章 結言

自作した酢酸セルロース膜を用いてヘキサン中の脂肪酸の膜分離特性について基礎的検討を行った結果、以下の知見を得ることができた。

単成分脂肪酸のヘキサン溶液の分離実験では、酢酸セルロース膜により、オレイン酸は保持液側に濃縮され、デカン酸およびミリスチン酸は透過液側に濃縮された。膜の阻止率は、使用した脂肪酸では分子量の順に小さくなり、ミリスチン酸とデカン酸では負の値を取ることが分かった。また、透過係数はオレイン酸はヘキサンよりも小さく、ミリスチン酸およびデカン酸ではヘキサンよりも大きくなった。オレイン酸とミリスチン酸を混合したヘキサン溶液のろ過実験を行った結果、オレイン酸とミリスチン酸の双方が透過液側で濃縮した。この結果については、物質収支の問題も含めて、今後、検討を行っていく必要があると考えられる。

本研究により脂肪酸が透過液側で濃縮する系をいくつか発見することができ、酢酸セルロース膜が脂肪酸に対して高い透過性を有することを示すことができた。

## 参考文献

- 1) 渡辺敦夫・中嶋光敏, 食品工業における科学・技術の進歩(Ⅱ)、日本食品工業学会編, 99-119(1986)
- 2) Wolfgang Pusch and Axel Walch, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **21**, 660-685(1982)
- 3) R.Subramanian and M.Nakajima, *J. Am. Chem. Oil Soc.*, **74**(8), 971-975(1997)
- 4) 安田耕作・福永良一郎・松井宣也・渡辺正男, 新版・油脂産業の知識、幸書房, 124-225(1993)
- 5) L.P.Raman, M.Cheryan, and N.Rajagopalan, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**(2), 219-224(1996)
- 6) N.S.Krishna Kumar and D.N.Bhowmich, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**(3), 399-401(1996)
- 7) Jos T.F.Keurentjes *et al.* *Ind. Eng. Chem. Res.*, **31**, 581-587(1992)
- 8) K.K.Reddy *et al.* *Sep. Sci. Tec.*, **31**(8), 1161-1178(1996)
- 9) 膜学実験シリーズ第Ⅲ巻 人工膜編, 共立出版 19-26(1983)
- 10) 六平雅樹, 東京大学工学部化学工学修士論文, 14-15(1995)

## 第Ⅱ部

Oil－Water 二相系でのリパーゼによる

トリオレインの加水分解速度

# 第1章 緒論

## 1.1 本研究の背景および目的

油脂は多様な生物資源の中で、炭水化物、タンパク質とならぶ最も重要な栄養源であり、生産量も多い。この油脂の加水分解により生成する高級脂肪酸は、化粧品、チョコレート、およびマーガリンなどの原料となる。現在、工業的な油脂の加水分解にはコルゲート・エメリー法が使用されている。この方法はオートクレーブ中、高温高压（250℃、50 気圧）の条件下で行われるため、生産コストは消費エネルギーに大きく左右される。また、目的物である脂肪酸以外の副産物も生成されるため、これらの分離精製操作が必要とされるなどの問題点がある。

そこで、高級脂肪酸の安価な工業的生産法として、油脂の加水分解酵素であるリパーゼを用いた方法の応用が検討されている。酵素を用いた加水分解法は常温、常圧、中性付近で行われるため、省エネルギー的である。また、酵素反応特有の作用特異性により副産物を生じないため、反応終了後の分離精製操作が容易となり分離効率の向上が期待できる<sup>1)</sup>。

しかし、基質である油脂は油相に溶解しているのに対し、酵素であるリパーゼは水溶性であるため油相中ではほとんど活性を示さない。そこで油脂の加水分解は油-水二相系で行われる。このような異相系反応は、二相接触界面積や反応器内の流動状態に反応速度が大きく依存すると考えられる。これまでリパーゼによる油脂の加水分解について多くの研究が行われてきた。これらの大部分は反応率を高めることを目的とした研究であり、乳化剤を加えたエマルション系<sup>2,3,4)</sup>、特殊な乳化剤を利用してエマルション系をさらに細かくした逆ミセル系<sup>5,6)</sup>などの反応系が用いられている。これらの二相接触界面積を増大させた系の利用により、反応率を向上することはできたが、生成物の分離や高価な酵素の回収が困難であるという問題点が依然として残っている。これらの問題を克服するために、リパーゼを何らかの担体に固定化する方法も検討されている<sup>7,8,9)</sup>が、その成功例は数少ない。

一方、リパーゼによる油脂の加水分解は、二相系での油脂と水の複雑な二基質反応である。しかし、その速度論解析には現在のところ、均相系の Michaelis-Menten 型と同様の速度式がそのまま適用されており、二相系二基質反応の速度論を詳細に検討した例は少ない<sup>10,11)</sup>。特に、油滴分散系では、分散滴径が界面張力などによって変化することが知られているため、反応機構の詳細な解析には適当でないと考えられる。そこで羽野ら<sup>10)</sup>は、溶媒による反応速度の差を詳細に検討するために、接触界面積が既知の平面接触攪拌槽を用いて、*Candida cylindracea* リパーゼによる市販のオリーブ油の加水分解実験を行った。そし

て、界面へ吸着した酵素に油相中のオリーブ油が反応するという新たな反応機構を提案するとともに、このモデルによって実験結果を解析し、総括的な加水分解速度定数を求めた。また、河野ら<sup>14)</sup>は、異相系での反応が界面現象によって大きく影響を受けることから、二相系において *Candida cylindracea* リパーゼによるオリーブ油の加水分解実験を行った。そして界面におけるリパーゼの吸着と加水分解反応を考慮したモデルを構築し、実験結果に基づいて速度定数と吸着平衡定数の推算を行った。しかしこれらの研究は、二相系で行われたものの、生成物である脂肪酸のみの分析しか行われておらず、反応機構や速度論は未だ明らかになったとはいえない。

そこで本研究では、リパーゼによる油脂の加水分解の基礎的研究として、液-液界面を一定とした Oil-Water 二相系において油脂であるトリオレインの加水分解実験を行い、基質および生成物の両物質の定量を行うことにより、反応挙動に及ぼす諸因子の影響を検討した。

## 1.2 本研究の概要

本研究では Oil-Water 二相系において、リパーゼによるトリオレインの加水分解実験を行い、基質であるトリオレインの消費および生成物であるオレイン酸の生成挙動に及ぼす初期基質濃度、酵素濃度、および生成物阻害の影響を検討した。

本論文の構成を以下に示す。

第1章では、本研究の背景、および目的について述べる。

第2章では、加水分解実験の方法、条件および分析について述べた。

第3章では、トリオレインの消費およびオレイン酸の生成量に及ぼす初期基質濃度、酵素濃度および生成物阻害の影響を検討するとともに、その結果に基づき反応機構について議論した。

第4章では、本研究の内容を総括した。

## 第2章 実験

### 2.1 実験装置

Fig. 2.1 に実験装置の概略図を示す。装置は反応容器と恒温槽からなる。反応容器は内径 8 cm の円筒形のガラス瓶で、油相中のヘキサンの揮発を防ぐために蓋付きのものを用いた。また、恒温槽は自動的に温度および振盪速度を設定できるものである。

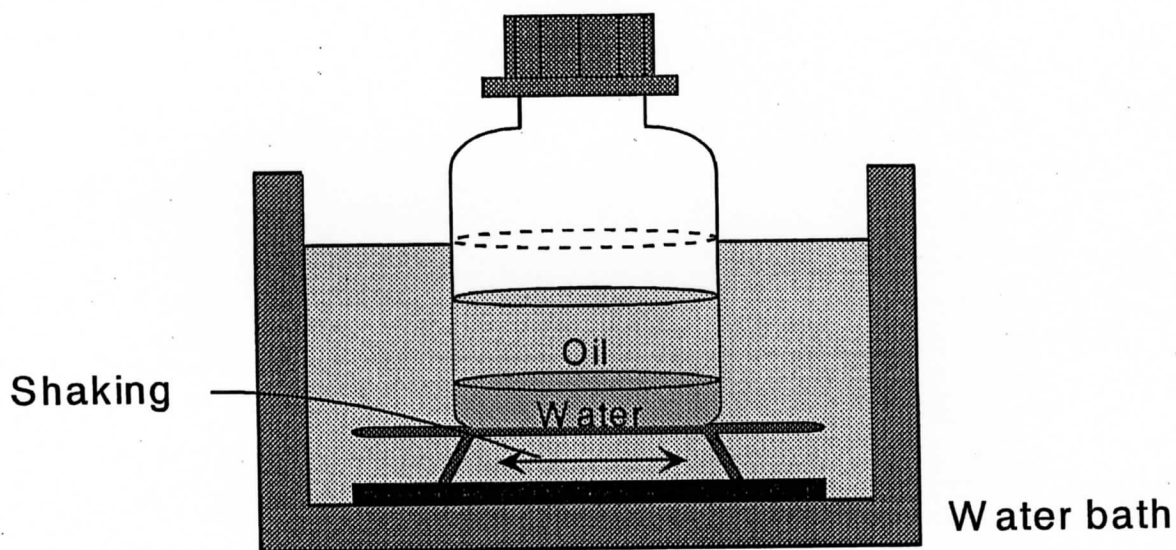


Fig. 2.1 Schematic diagram of experimental apparatus

## 2.2 実験方法および条件

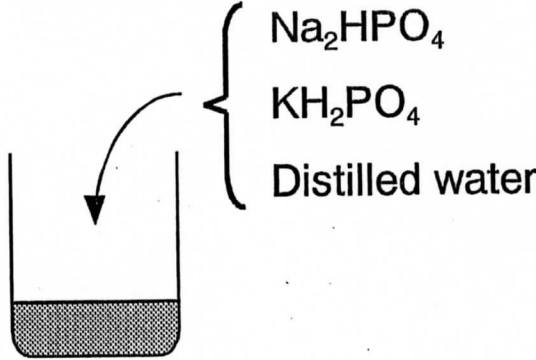
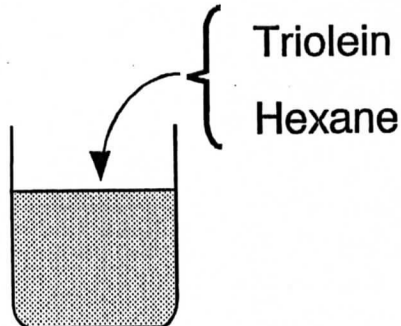
Fig. 2.2 に実験手順を示す。油相には基質としてトリオレインを用い、所定濃度でヘキサンに溶解させ 100 g とした。水相は、初めに  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を用いて 0.05 M のリン酸緩衝液(pH 6.7)を調整し、pH を確認した後、この水溶液に酵素として *Candida rugosa* 由来のリパーゼを所定量溶解させ 25 g とした。次に、反応容器に水相を入れ、その上に油相を静かに重層して二相系とし、この容器を恒温槽中で二相が混合しない程度まで十分に振盪させて反応を行った。

反応条件を Table 2.1 に示す。温度は 40°C で一定、水相の pH は 6.7 とした。そして、初期基質濃度を 5, 10, 15 wt%、あるいは酵素濃度を 1, 4 wt% と変化させた。また、オレイン酸の生成物阻害の影響をみるために、基質を含む油相中に初めから所定濃度のオレイン酸を添加した系でも実験を行った。どの条件下でも反応時間は 140 h とした。そして、所定時間ごとにマイクロピペットで油相からサンプル 1 cm<sup>3</sup> を採取し、基質であるトリオレインと生成物であるオレイン酸の濃度を測定した。

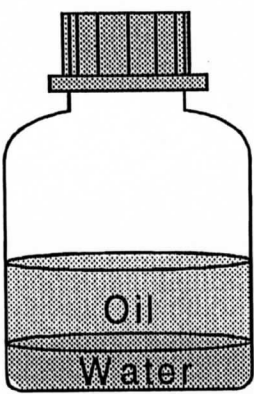
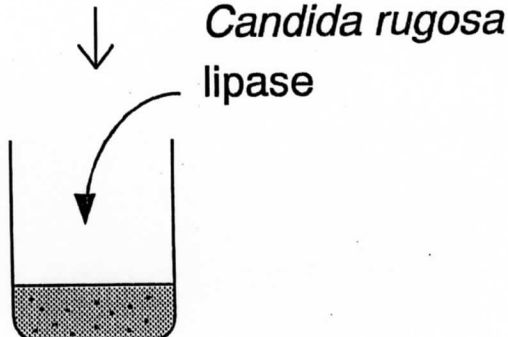
本実験で使用した試薬を Table 2.2 に示す。

Oil phase

Water phase



pH 確認



Reaction

Fig. 2.2 Experimental procedure



Table 2.1 Experimental conditions

Temperature	40	[°C]
pH in water phase	6.7	
Initial substrate concentration	5, 10, 15	[wt%]
Enzyme concentration	1, 4	[wt%]
Oleic acid concentration added to substrate	1, 2	[wt%]
Reaction time	140	[h]

Table 2.2 Reagents

Triolein	purity 70%~	(WAKO)
Hexane	purity 96%~	(WAKO)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S.G.	(WAKO)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	S.G.	(WAKO)
<i>Candida rugosa</i> lipase		(SIGMA)
Oleic acid	purity 99%~	(WAKO)

2.3 分析

採取したサンプル中のトリオレインおよびオレイン酸濃度は、サンプルを疎水性の 0.5  $\mu\text{m}$  フィルター(TOYO)で濾過した後、LC MS を用いて分析した。

分析条件は、カラム温度を 30℃とし、溶離液を Table 2.3 に示す条件で供給した。

また、分析に用いた LC MS の仕様を Table 2.4 に示す。

Table 2.3 Feed condition of eluent

Time [min]	Eluent	Flow rate [cm <sup>3</sup> /min]
0	methanol 1000	0.3
15	methanol 1000	0.3
16	methanol 1000 : acetone 1000 = 30 : 70	1.0
40	methanol 1000 : acetone 1000 = 30 : 70	1.0

Table 2.4 LC MS specification

Mass Spectrometer	: HITACHI M-8000
Column oven	: HITACHI L-7300
UV detector	: HITACHI L-7400
Pump	: HITACHI L-7100
Interface	: HITACHI L-7000
Inertsil ODS column $\phi 4.6 \times 250$ mm	: GL SCIENCE

# 第 3 章 結果と考察

## 3.1 初期基質濃度の影響

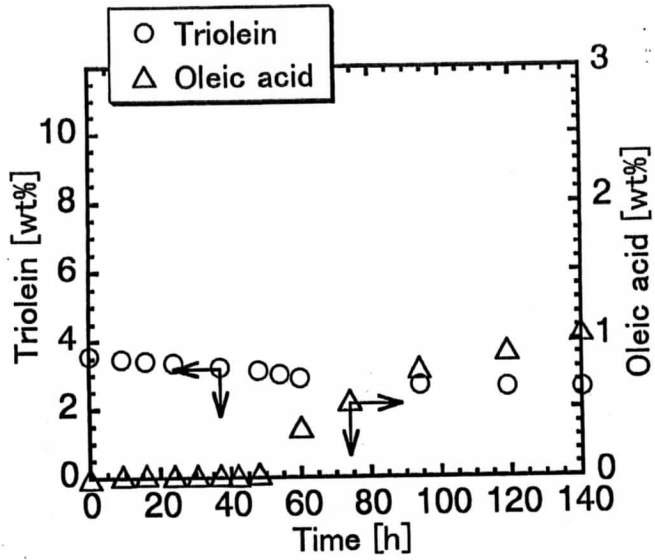
Fig. 3.1 に酵素濃度を 1 wt% で一定とし、初期基質濃度を変化させた場合の実験結果を示す。(a) は 5 wt%、(b) は 10 wt%、(c) は 15 wt% である。図より、どの初期基質濃度においても、トリオレインの濃度は反応開始時から徐々に減少している。これに対して、オレイン酸は反応初期ではわずかしこ生成していないが、時間の経過とともにその濃度は増加し、次第に頭打ちになる傾向がある。これは反応終期に生成物阻害あるいは酵素活性の低下が起こっているため<sup>9)</sup>と考えられる。また、初期基質濃度が大きくなるにつれて、反応初期に観察されるオレイン酸がわずかしこ生成していない期間が短くなり、反応速度も大きくなっていることがわかる。

Table 3.1 に各条件下における初期基質濃度および最終基質濃度と、これより求めた反応率を示す。初期基質濃度が仕込み濃度と異なるのは、試薬に純度 70 % のトリオレインを用いているためである。表より、反応率は初期基質濃度が小さいほど大きい値を示していることがわかる。これは、基質濃度が小さいほど酵素単位量当たりの基質量が少ないこと、また、基質濃度が高い領域では基質阻害も起こること<sup>6)</sup>などが理由として考えられる。

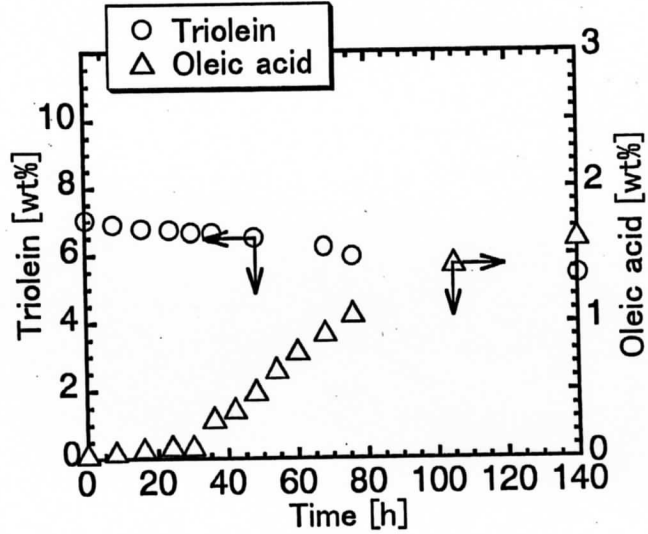
Table 3.1 Conversions

	Enzyme conc.	Initial substrate conc.	Final substrate conc.	Conversion
(a)	1 wt%	3.55 wt%	2.59 wt%	27.2 %
(b)	1 wt%	7.05 wt%	5.42 wt%	23.1 %
(c)	1 wt%	10.7 wt%	8.85 wt%	16.9 %

(a) 5 wt%



(b) 10 wt%



(c) 15 wt%

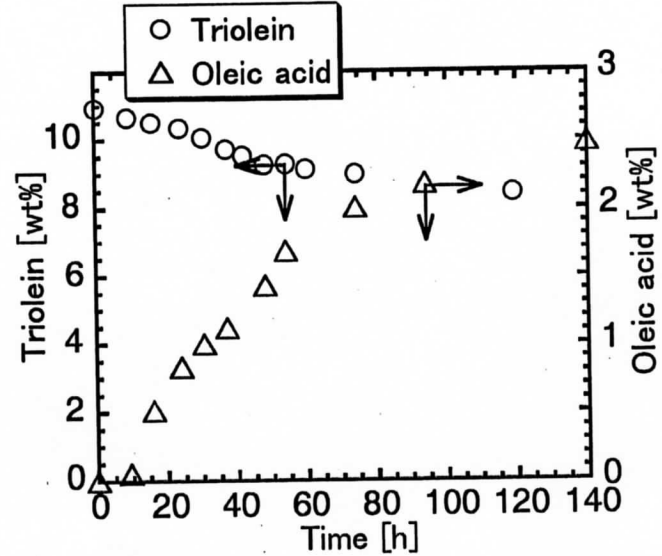


Fig. 3.1 Time courses of triolein and oleic acid concentrations at different initial substrate concentrations

3.2 酵素濃度の影響

Fig. 3.2 に、初期基質濃度を 10 wt% で一定とし、酵素濃度を変化させた場合の実験結果を示す。(a) は 1 wt%、(b) は 4 wt% である。図より、酵素濃度を 1 wt% から 4 wt% に増加させた場合でも同様に、トリオレインの濃度は反応開始時から徐々に減少しているが、オレイン酸は反応初期ではわずかしかな生成せず、時間の経過とともにその濃度は増加し、次第に頭打ちになるという傾向を示す。また当然のことながら、反応速度は酵素濃度の大きい方が大きくなっていることがわかる。反応初期に観察されるオレイン酸の生成量がわずかとなっている期間の長さは、基質濃度を増加させた場合では、反応速度の増加とともに著しく小さくなった。しかし、酵素濃度を増加させた場合では、反応速度が大きくなってもこの期間の著しい減少は見られない。

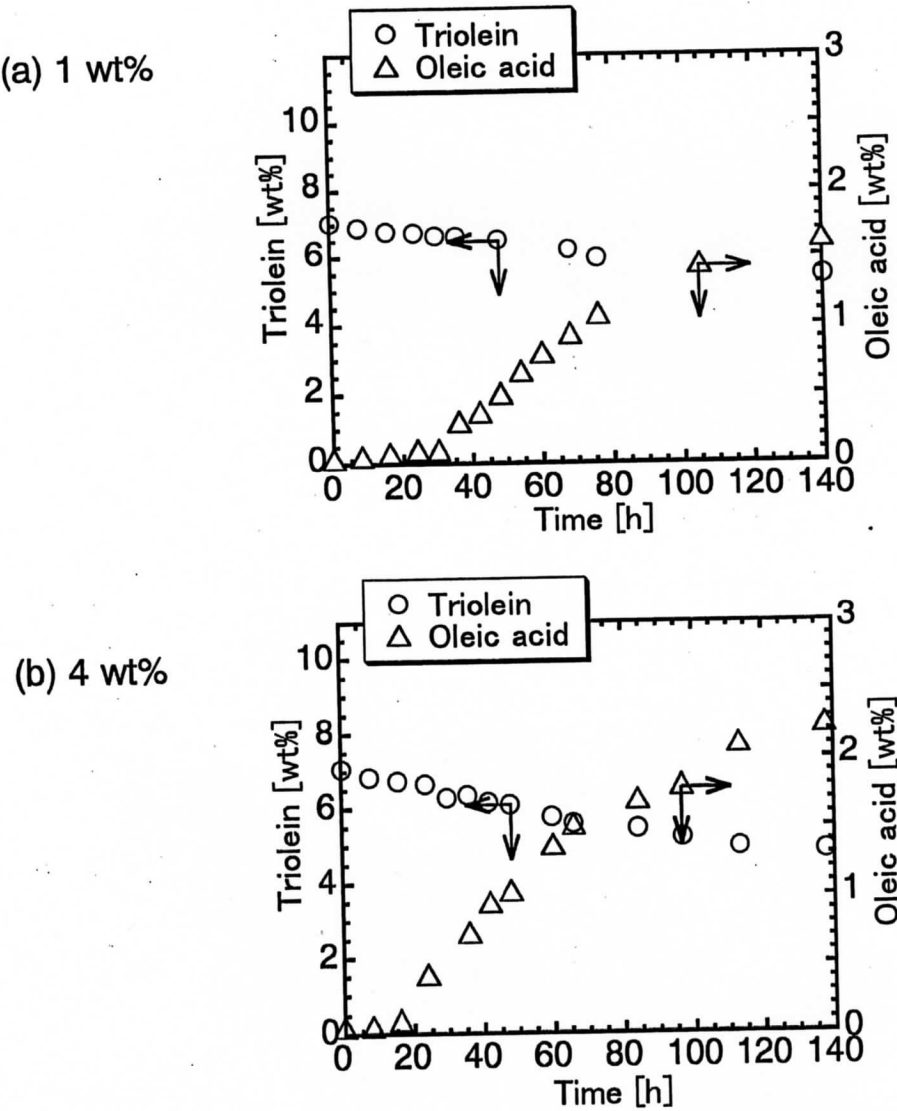


Fig. 3.2 Time courses of triolein and oleic acid concentrations at different enzyme concentrations

また、Table 3.2 に各条件下における初期基質濃度および最終基質濃度と、これより求めた反応率を示す。実験では、酵素濃度を 4 wt%まで増加させることにより、反応率を 31 %にまで高めることができた。しかし、4 wt%という濃度はかなり高いものであり、ほぼ飽和濃度に近い。そのため、酵素濃度によって反応率を高めるのはこれが限界と考えられる。

Table 3.2 Conversions

	Enzyme conc.	Initial substrate conc.	Final substrate conc.	Conversion
(a)	1 wt%	7.05 wt%	5.42 wt%	23.1 %
(b)	4 wt%	7.06 wt%	4.86 wt%	31.1 %

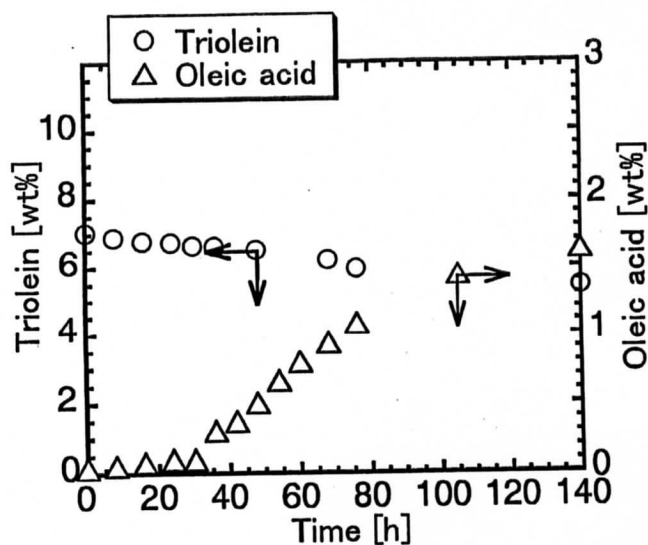
### 3.3 生成物阻害の影響

前述した初期基質濃度および酵素濃度を変化させた実験では、反応終期においてトリオレインの加水分解反応の進行が頭打ちになり、それ以上進まなくなる現象が観察された。一般にこの現象は、オレイン酸の生成物阻害あるいは酵素活性の低下によるものと考えられている<sup>9)</sup>。そこでこのことを確認するために、初期基質濃度を 10 wt% で一定とした基質溶液に予め種々の濃度のオレイン酸を添加した系において、同様に加水分解実験を行った。その結果を Fig. 3.3 に示す。(a) はオレイン酸を入れていない系、(b) は 1 wt%、(c) は 2 wt% のオレイン酸を予め添加した系である。また、トリオレインの減少量を詳しく見るために、トリオレイン濃度の経時変化を拡大した図をそれぞれ(a'), (b'), (c') に示す。

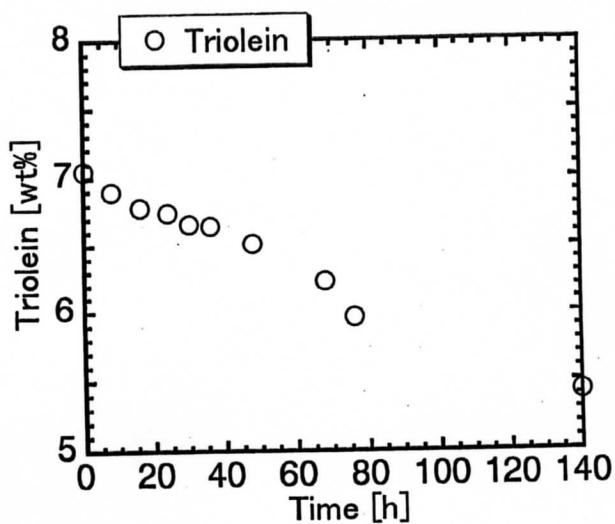
図より、オレイン酸を添加した系においても、添加しない系と同様にトリオレインの濃度は反応開始時から減少している。オレイン酸に関しては、添加しない系では初めわずかしか生成していないのに対し、添加した系では初めからかなりの量のオレイン酸の生成が観察される。しかし、どちらの系においても時間の経過とともに、トリオレイン濃度の減少およびオレイン酸濃度の増加は頭打ちになる傾向を示している。また、オレイン酸の添加量を増加させると、反応速度が増加していることがわかる。これらのことから、オレイン酸を予め添加した系において本加水分解反応の進行は、促進される傾向にあると考えられる。

Tsai ら<sup>9)</sup>は逆相ミセル系で *Candida cylindracea* リパーゼの活性の検討を行っている。そして、オレイン酸を添加しない系では、リパーゼの活性が反応開始後 30 分程度で 5 % にまで低下するのに対し、25 mM のオレイン酸を添加した場合 40 % 程度までの低下で抑えることができ、さらにオレイン酸濃度を高くすると、この活性の低下を抑える力が大きくなることを報告している。これは反応阻害物質であるオレイン酸がリパーゼの活性部位に吸着すると、リパーゼが保護された形となり、化学的変性速度が低減されるためと考えられている。また、彼らはリパーゼによる油脂の加水分解速度が時間の経過とともに頭打ちになっていく理由として、基質濃度が低い場合では主に生成物阻害によるものであり、高い場合では主に酵素活性の低下によるものであることも報告している。以上のことから、二相系における本反応において初期基質濃度 10 wt% の場合、添加したオレイン酸によって、リパーゼの活性の低下が抑制され、加水分解が促進されたと考えられる。ただ、この考察はあくまで推論に過ぎず、今後、オレイン酸の添加量や添加時間などを変えて実験を行い、更なる検討を行う必要がある。

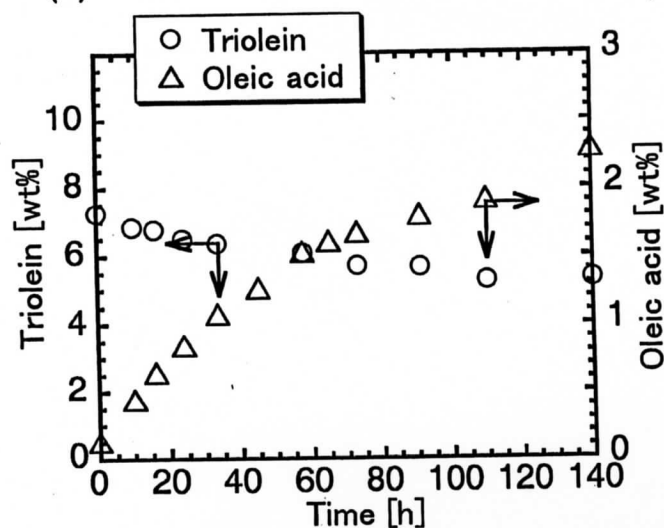
(a) 0 wt%



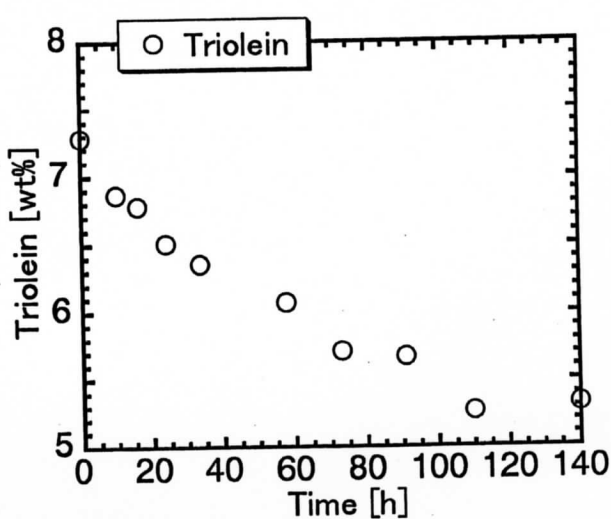
(a') 0 wt%



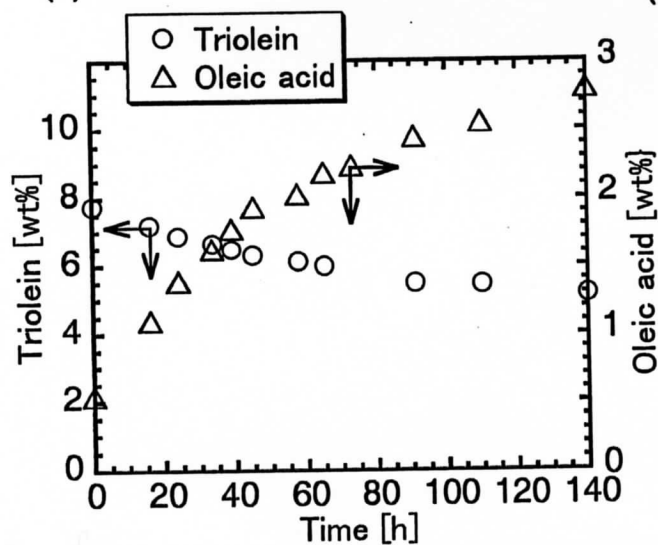
(b) 1 wt%



(b') 1 wt%



(c) 2 wt%



(c') 2 wt%

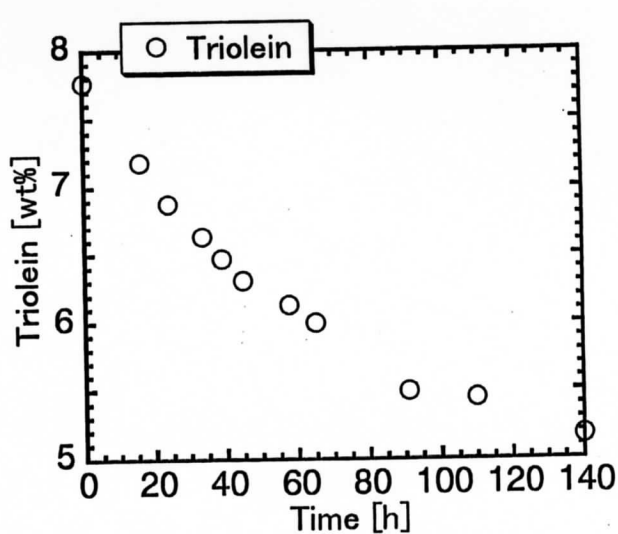


Fig. 3.3 Time courses of triolein and oleic acid concentrations at different concentrations of oleic acid added to substrate



また、Table 3.3 に各条件下における初期基質濃度および最終基質濃度と、これより求めた反応率を示す。この表からもわかるように、結果的に、添加したオレイン酸は酵素の活性を長く保持し、反応率を高めることになったと考えられる。

Table 3.3 Conversions

	Enzyme conc.	Oleic acid conc. added	Initial substrate conc.	Final substrate conc.	Conversion
(a)	1 wt%	0 wt%	7.05 wt%	5.42 wt%	23.1 %
(b)	1 wt%	1 wt%	7.28 wt%	5.32 wt%	26.9 %
(c)	1 wt%	2 wt%	7.76 wt%	5.17 wt%	33.4 %

### 3.4 反応機構の検討

リパーゼによるトリオレインの加水分解反応の反応式を(3.1)-(3.3)式で表す。本実験で用いた酵素である *Candida rugosa* リパーゼは、位置選択性がなくトリオレインの三つのエステル結合部位を全て切断すると報告されている。そのため、トリオレインの加水分解反応は酵素によりエステル結合が一つずつ切れ、ジオレイン、モノオレイン、グリセリンへと逐次的に進行していくものと考えられる。尚、(3.1)-(3.3)の反応式における酵素の切断位置は参考のために示したものであり、実際の位置選択性を表現するものではない。

そこで、本反応において消費されたトリオレインが全てジオレインのみに変換された場合、あるいはモノオレイン、グリセリンのみに変換された場合の三つの状態を仮定し、本実験から得られたトリオレインの減少量を最小二乗法で相関した値から、それぞれの場合に生成するオレイン酸量を計算した。

また、オレイル基に基づく物質収支の経時変化も実験結果に基づき計算した。

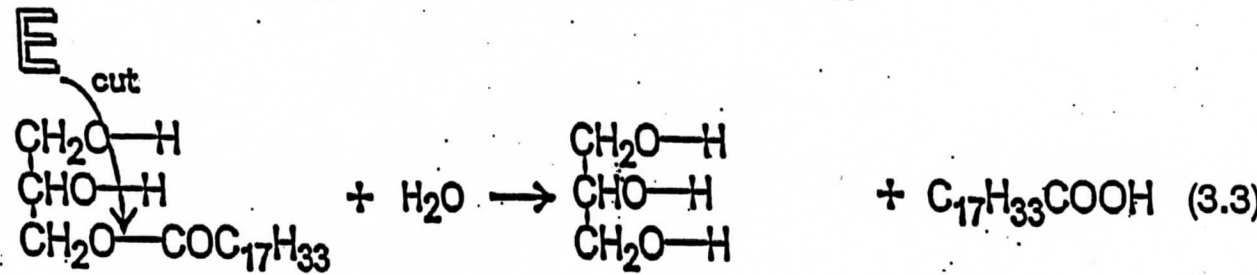
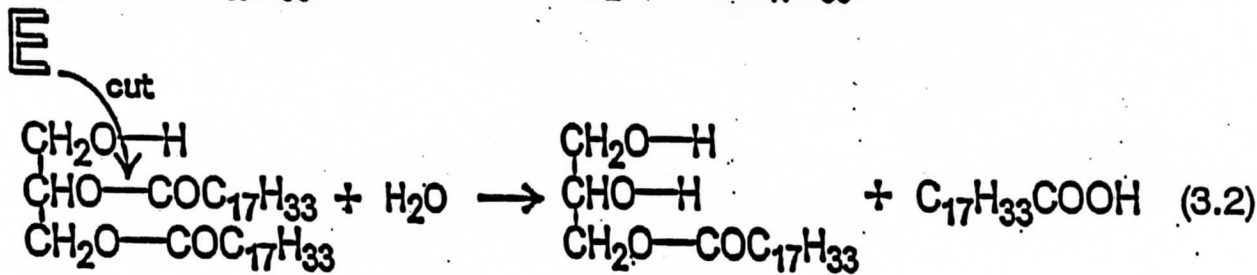
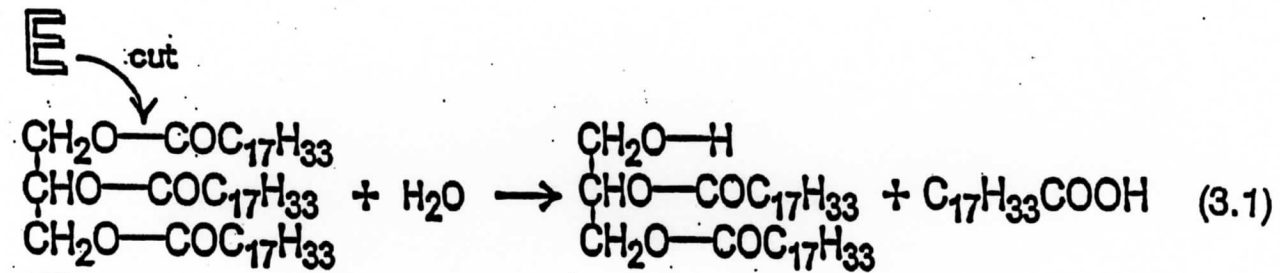


Fig. 3.4 に初期基質濃度を変化させた場合のオレイン酸量の計算結果を、前述した実験結果とともに示す。図より、どの初期基質濃度においても、オレイン酸の実験値は、反応初期においてはジオレインのみが生成したとする計算線と近くなっているが、時間の経過とともにグリセリンのみが生成したとする計算線に近づくことがわかる。Fig. 3.5 に、初期基質濃度を変化させた場合のオレイル基に基づく物質収支の経時変化を示す。また、物質収支が1となるラインを点線で示す。図より、反応初期において物質収支が1を下回っている期間が存在することがわかる。本実験ではトリオレインとオレイン酸の濃度しか測定していない。そのため物質収支が1を下回っている部分は中間生成物であるジオレインやモノオレインの存在を意味していると考えられる。以上のことから、反応初期においては、トリオレインからジオレインへの反応が支配的に起こっていると考えられる。

また、反応終期においてはトリオレインの減少が頭打ちになっており、中間生成物が存在していないことがわかる。液-液界面での本反応の模式図を Fig. 3.6 に示す。ここで、Plou<sup>1)</sup>らは、トリオレインの加水分解において、トリオレインからジオレイン、ジオレインからモノオレイン、モノオレインからグリセリンへの各段階の反応の速度定数の測定を行っており、一段目のトリオレインからジオレインへの反応が最も遅いことを報告している。本加水分解実験では、反応終期において、オレイン酸の生成物阻害あるいは酵素活性の低下のために、各段階の反応速度が低下していくと考えられる。この際、速度定数の違いにより、最も遅い反応である一段目のトリオレインからジオレインへの反応が最初に停止するため、トリオレインの減少が止まると考えられる。この時点では次の二つの反応は完全に停止していないため、油相中に存在していたジオレインやモノオレインなどの中間生成物は速やかに分解され、最終的にグリセリンの形で水相中に抽出されるため、油相中に存在しなくなると考えられる。

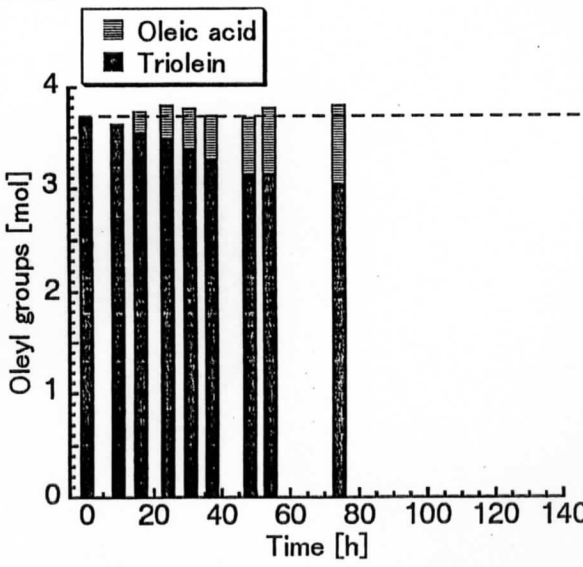
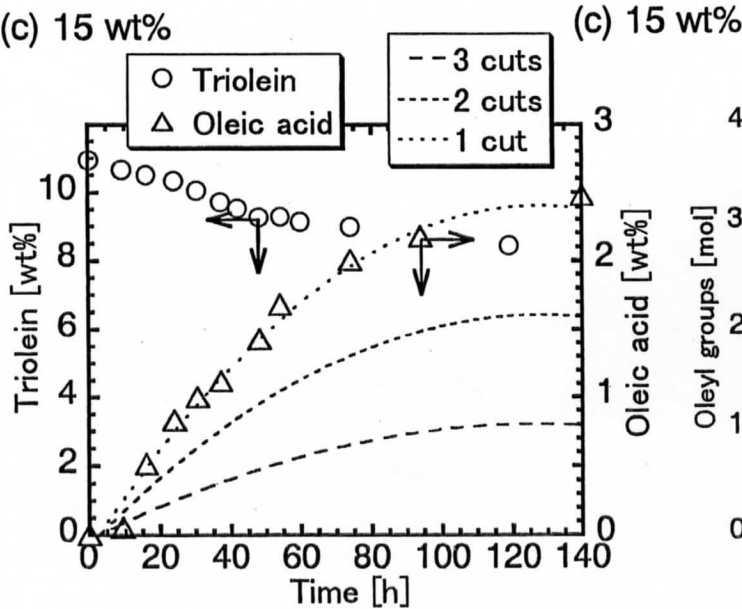
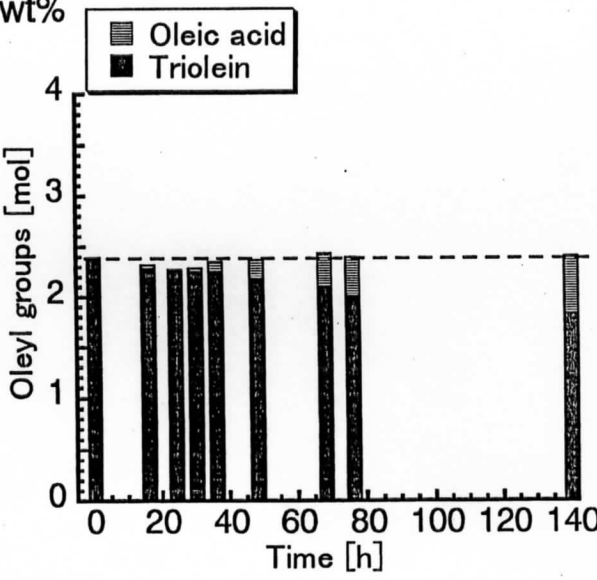
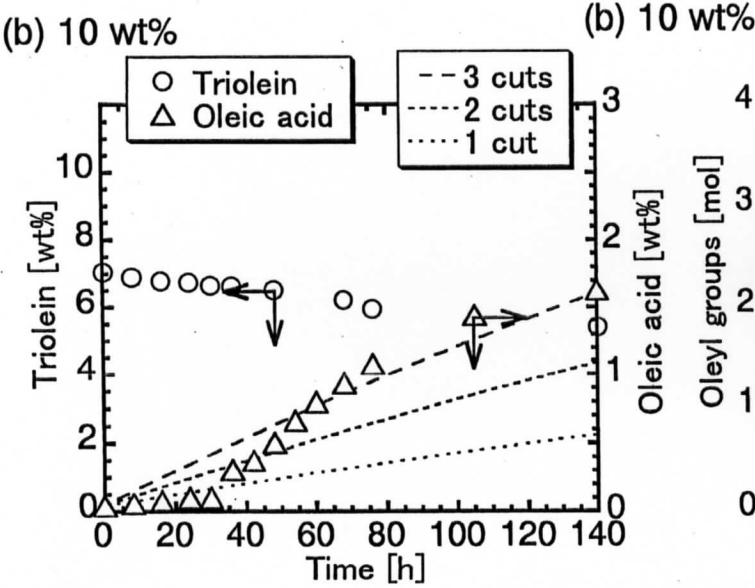
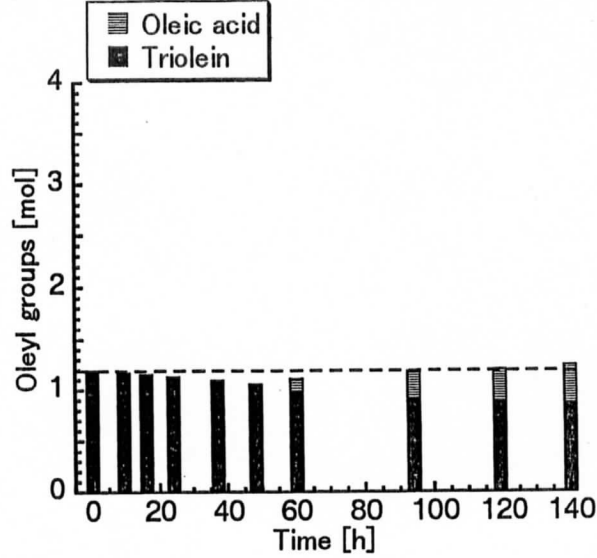
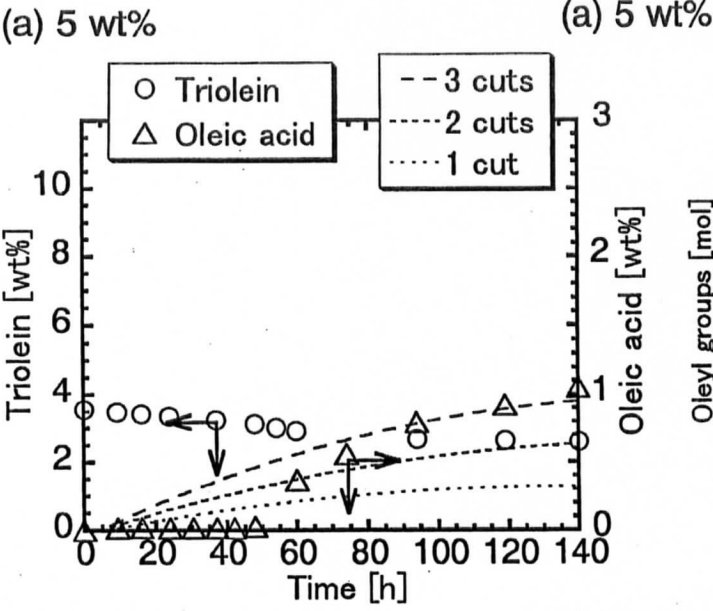


Fig. 3.4 Calculation results

Fig. 3.5 Oleyl group balances

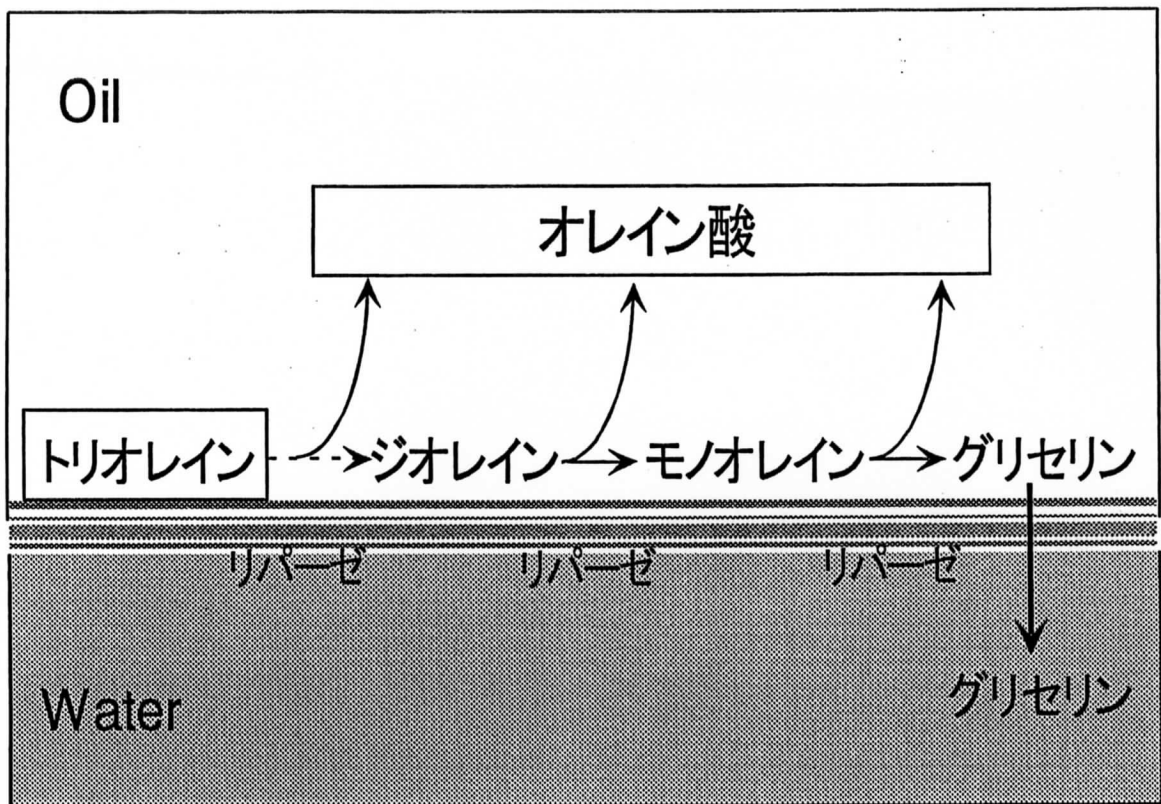
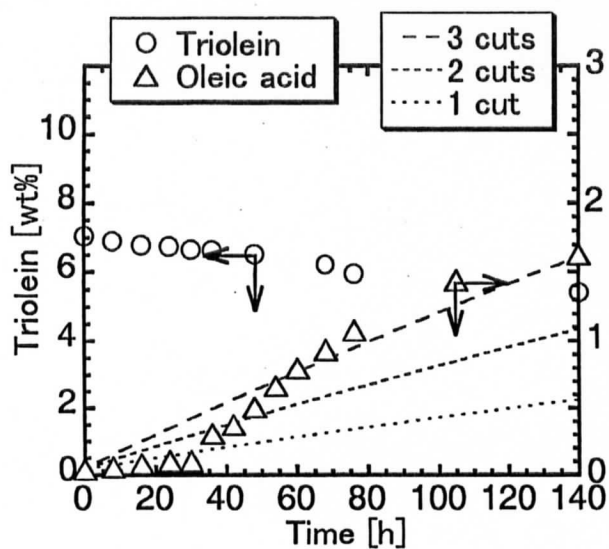


Fig. 3.6 Schematic diagram of lipase-catalyzed reaction at oil-water interface

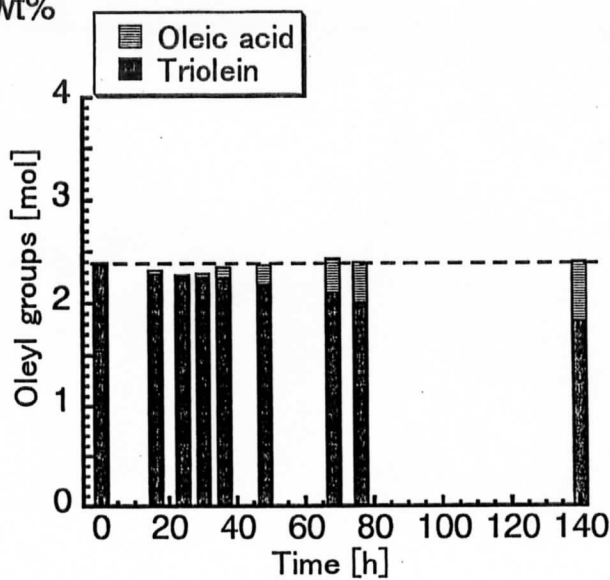
Figs. 3.7, 3.8 に、酵素濃度を変化させた場合のオレイン酸の計算および実験結果とオレイル基の物質収支を同様に示す。酵素濃度を変化させた場合でも、反応初期においてはジオレインのみが生成したとする計算線に近くなっており、その際物質収支が1を下回っていることから、反応初期ではトリオレインからジオレインへの反応が支配的であると考えられる。また、反応後期でも同様に、中間生成物が存在しない状態でトリオレインの減少が頭打ちになっている。この場合、初期基質濃度は10 wt%と高い値であるため、一段目の反応が停止した原因は、酵素の活性の低下によるものと考えられる。

Figs. 3.9, 3.10 に、基質溶液にオレイン酸を予め添加した実験についても同様に計算結果と物質収支を示す。図より、オレイン酸を添加した場合では、反応初期にジオレインのみが生成するとしたラインと重なる期間はほとんど観察されず、グリセリンのみが生成するとしたラインに従ってオレイン酸濃度が増加していることがわかる。また、反応初期の物質収支が1を下回る期間もほとんど観察されていない。これより、酵素活性の低下がオレイン酸の添加により抑制されているため、各反応が速やかに起こっていると考えられる。

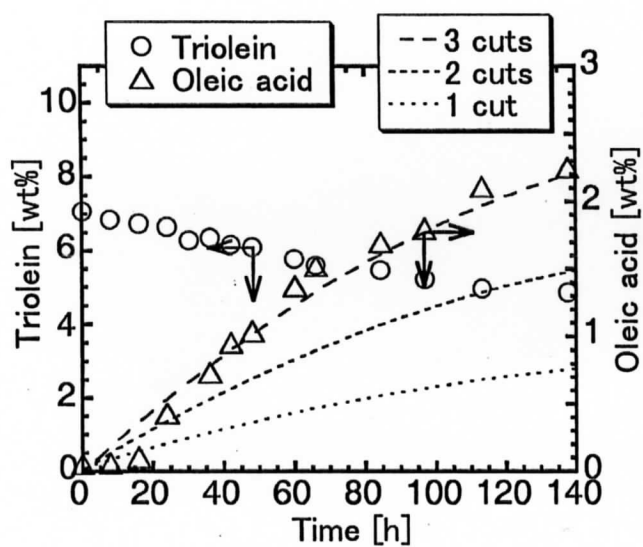
(a) 1 wt%



(a) 1 wt%



(b) 4 wt%



(b) 4 wt%

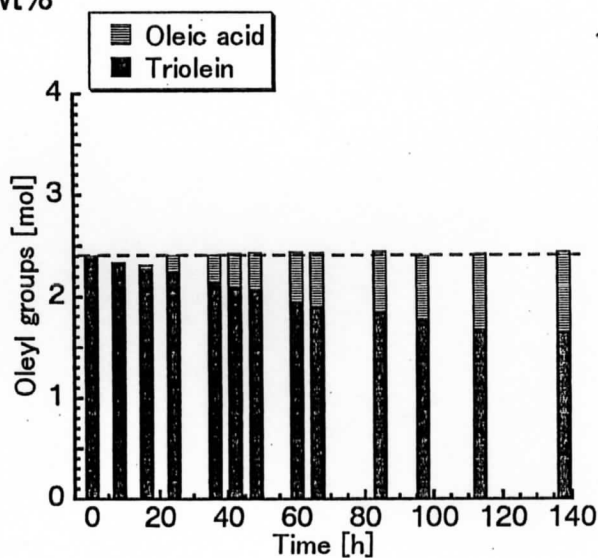


Fig. 3.7 Calculation results

Fig. 3.8 Oleyl group balances

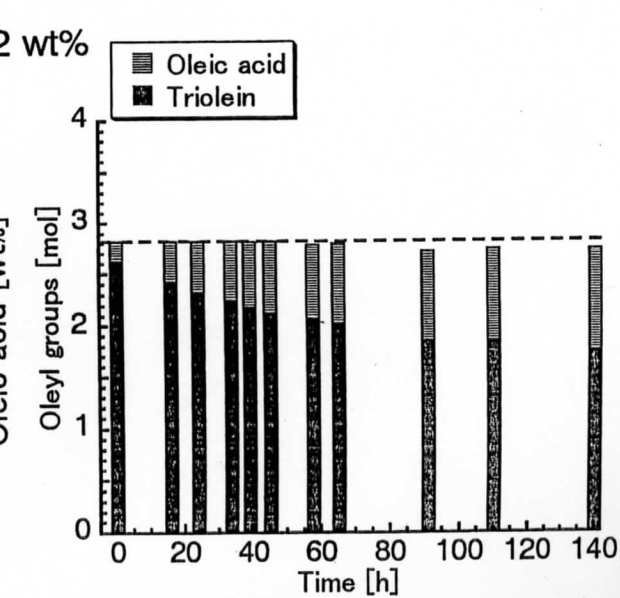
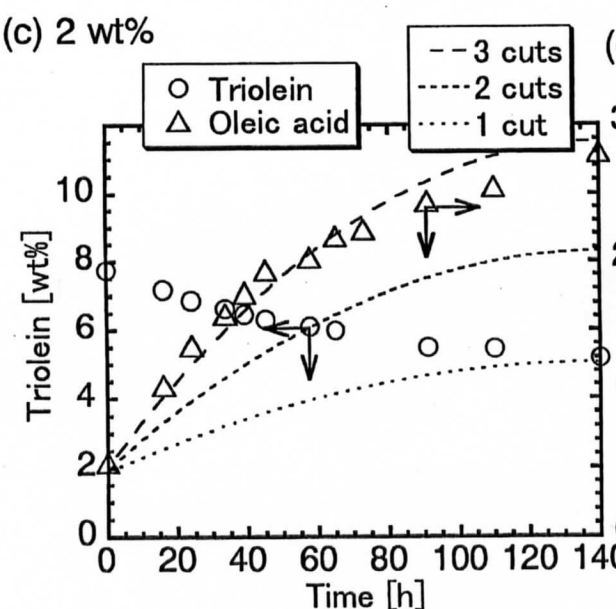
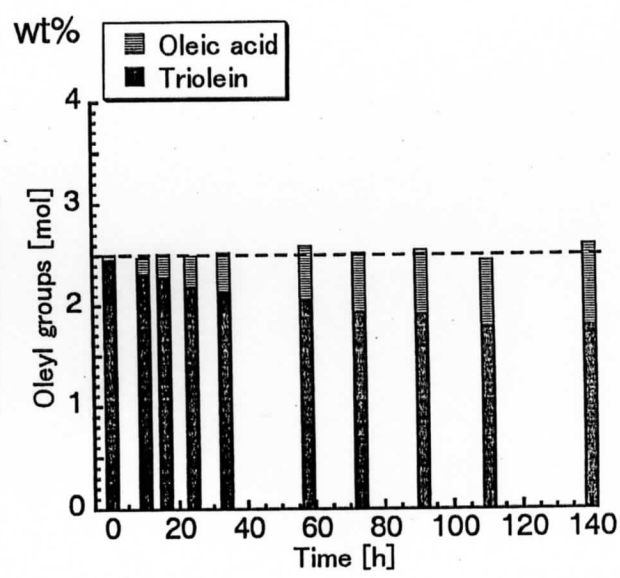
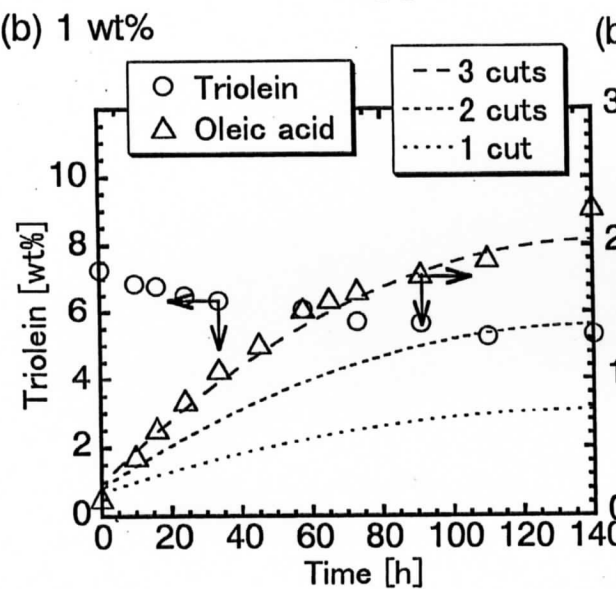
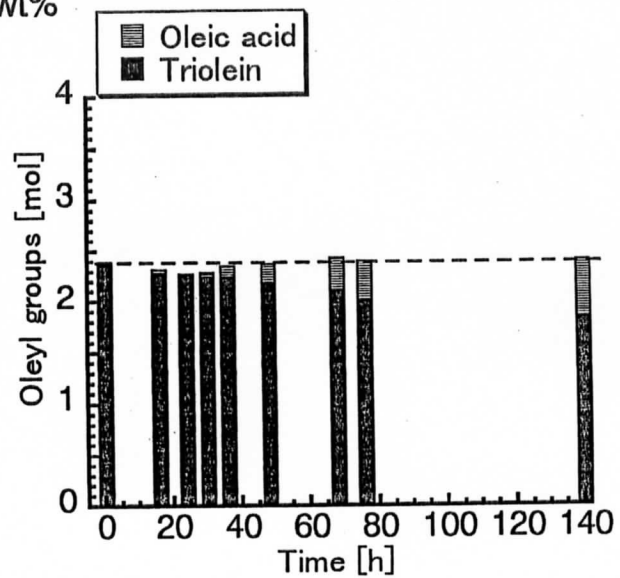
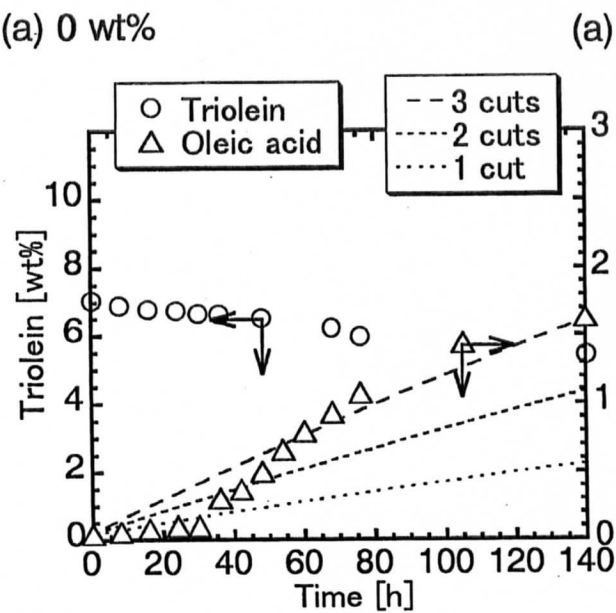


Fig. 3.9 Calculation results

Fig. 3.10 Oleyl group balances

## 第4章 結言

本研究では、Oil-Water 二相系においてリパーゼによるトリオレインの加水分解実験を行った。本実験から得られた知見として次のことが挙げられる。

①トリオレインの加水分解は逐次的に起こる。

②反応初期においては、トリオレインからジオレインへの反応が支配的であり、その期間は初期基質濃度が小さいほど長くなり、酵素濃度の影響は余り受けない。

③反応終期においては、ジオレインやモノオレインなどの中間生成物が存在しない状態で、トリオレインの減少が停止していることから、生成物阻害あるいは酵素活性の著しい低下により、一段目の反応が初めに停止していると考えられる。

④本反応で添加したオレイン酸は、阻害の影響が小さく、逆に酵素の活性を長い時間保持する。



## 参考文献

- [1] 後藤ら, 中空糸膜型バイオリアクターを用いたリパーゼによるトリオレインの加水分解機構, 化学工学論文集, **17**, 477-483(1991)
- [2] J.G.T.Kierkels et al., "Lipase Kinetics: On-line measurement of the interfacial area of emulsions", *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 760-763 (1990)
- [3] Kim C. O'Connor et al., "Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase". *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 352-357 (1988)
- [4] K. Shiomori et al, "Hydrolysis Rates of Olive Oil by Lipase in a Monodispersed O/W Emulsion System Using Membrane Emulsification", *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 552-558 (1995)
- [5] Fangxiao Yang et al, "A Comparison of Lipase-Catalyzed Ester Hydrolysis in Reverse Micelles, Organic Solvents, and Biphasic Systems", *Biotech. Bioeng.*, **47**, 60-70 (1995)
- [6] Shau-Wei Tsai et al, "Kinetics, Mechanism, and Time Course Analysis of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of High Concentration Olive Oil in AOT-Isooctane Reversed Micells", *Biotech. Bioeng.*, **38**, 206-211 (1991)
- [7] M. Murray et al, "Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis", *Process Biochemistry*, **32**, 479-486 (1997)
- [8] Y. Kimura et al, "Application of Immobilized Lipase to Hydrolysis of Triacylglyceride", *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 107-112 (1983)
- [9] Ewa Lie et al, "Hydrolysis and Esterification with Immobilized Lipase on Hydrophobic and Hydrophilic Zeolites", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 549-553 (1991)
- [10] 羽野ら, リパーゼによるオリーブ油加水分解反応の動力学, 化学工学論文集, **17**, 449-454(1991)
- [11] Y. Kawano et al, "Hydrolysis Kinetics of Olive Oil with Lipase in a Transfer Cell", *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 283-287 (1994)

[12] Francisco J. Plou et al, "High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein", *Enzyme and Microb. Technol.*, **18**, 66-71 (1996)